

PCT/JP 2004/019330
14. 3. 2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 1 1 月 5 日

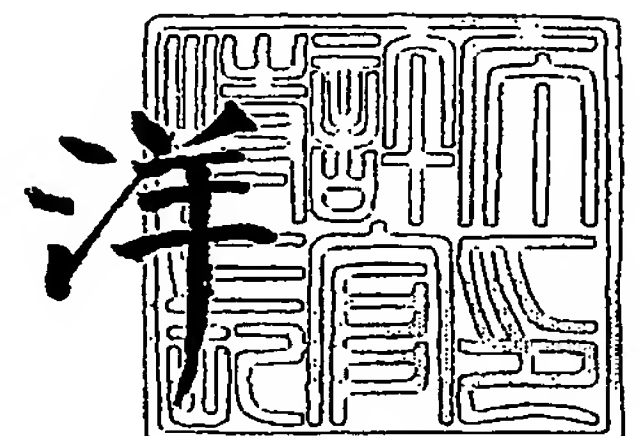
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 3 2 2 5 8 7
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 3 2 2 5 8 7]

出 願 人
Applicant(s): カルピス株式会社

2 0 0 5 年 1 月 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 0 2 4 1

【書類名】 特許願
【整理番号】 P04-536
【提出日】 平成16年11月 5日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5 - 1 1 - 1 0 カルピス株式会社基礎
 研究フロンティアラボラトリー内
 【氏名】 吉村 千秋
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 5 - 1 1 - 1 0 カルピス株式会社基礎
 研究フロンティアラボラトリー内
 【氏名】 増山 明弘
【特許出願人】
 【識別番号】 000104353
 【氏名又は名称】 カルピス株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100081514
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 酒井 一
【選任した代理人】
 【識別番号】 100082692
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 蔵合 正博
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003-429243
 【出願日】 平成15年12月25日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 007010
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0014648

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

ラクトバチルス・ヘルペティカスにより乳を発酵させて得られる発酵乳ホエーを有効成分として含む経口摂取用保湿剤。

【請求項 2】

ラクトバチルス・ヘルペティカスが、ラクトバチルス・ヘルペティカス CM4 株(独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター寄託番号：FERM BP-6060)である請求項 1 記載の経口摂取用保湿剤。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の経口摂取用保湿剤を含み、保湿作用を有することを特徴とする機能性飲食品。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 経口摂取用保湿剤及び機能性飲食品

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚の保湿作用を経口的に得られる経口摂取用保湿剤及び該作用を有する機能性飲食品に関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚組織の水分保持を促進する保湿作用の発現機序としては、特定のアミノ酸から主に構成されるいわゆる天然保湿因子の増加による角層の水分保持、角層の水分を保持するバリアとして機能する細胞間脂質の増加による角質細胞の水分の保持、及び天然保湿因子の流出防止等が知られている。天然保湿因子の主体をなすアミノ酸は、表皮ケラチノサイトが産生するフィラグリンというタンパク質の分解により供給されるため、フィラグリン産生促進能が保湿作用発現において重要な役割を果たす。また、細胞間脂質は多種の脂質を含み多数の酵素反応により表皮において生成されるが、その中でもセラミドの生成が重要であり、その生成においてはセリンパルミトイルトランスフェラーゼによるスフィンゴシン骨格の形成が重要な役割を果たす。

【0003】

このような皮膚の保湿作用を示す成分の探索は、特に、外用を目的とした化粧品や皮膚外用剤分野において従来から数多くなされている。例えば、保湿作用を期待して、発酵乳ホエー及びその精製物等を化粧品等に配合することが多数提案されている。具体的には、特許文献1及び2において、発酵乳ホエーを外用的に使用することにより保湿作用が得られることが示されている。また、特許文献3には、プロテアーゼ及び乳酸菌の培養上清を含む皮膚外用剤が保湿作用を示すことが開示され、該乳酸菌の例示としてラクトバチルス・ヘルペティカスに記載されている。

【0004】

しかし、この特許文献3を含め、従来、ラクトバチルス・ヘルペティカスを用いた発酵乳ホエーを実際に外用的に使用することにより保湿作用を確認した例は見当たらない。但し、特許文献4において、ラクトバチルス・ヘルペティカスMIKI-020(FERM P-13678)株の培養物又はその代謝産物が、メラニン産生抑制作用及びコラーゲン産生促進作用を有することについては記載されているが、保湿作用については何等教示されていない。

更に、前記特許文献2及び3には、発酵乳ホエーを含む皮膚外用剤を飲食品類へ利用できるという記載がなされている。しかし、このような皮膚外用剤をどのように飲食品類に利用するのか、また利用した際にどのような作用が得られるかについては何等示されていない。

ところで、発酵乳ホエー以外の成分ではあるが、従来、経口摂取及び外用的使用の両方において保湿作用が示された提案も多少なされている。しかし、通常、これら使用の一方でその効果が確認できた成分が、他方の使用においても同様な効果が得られることが一般的になっているものではなく、同様な効果が得られない成分も多数存在している。

【特許文献1】 特開2001-31557号公報

【特許文献2】 特開平11-228339号公報

【特許文献3】 WO 01/019324号パンフレット

【特許文献4】 特開2002-80340号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、経口摂取により皮膚の保湿作用が得られる機能性飲食品及び該機能性飲食品等に用いる経口摂取用保湿剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明によれば、ラクトバチルス・ヘルペティカスにより乳を発酵させて得られる発酵乳ホエーを有効成分として含む経口摂取用保湿剤が提供される。

また本発明によれば、前記経口摂取用保湿剤を含み、保湿作用を有することを特徴とする機能性飲食品が提供される。

【発明の効果】

【0007】

本発明の経口摂取用保湿剤及びこれを含む機能性飲食品は、既に経口摂取によりその安全性が確認されている、ラクトバチルス・ヘルペティカスにより乳を発酵させて得られる発酵乳ホエーを有効成分とするので、安全に経口的に優れた保湿作用を得ることができ、継続的摂取により季節や気候変化による肌のかさつき等の抑制や、美肌効果等が期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下、本発明を更に詳細に説明する。

本発明の経口摂取用保湿剤は、ラクトバチルス・ヘルペティカスにより乳を発酵させて得られる発酵乳ホエーを有効成分として含む。

ラクトバチルス・ヘルペティカスの菌株としては、菌体外プロテイナーゼ活性の高いものが好ましい。例えば、Twiningらの方法(Twining, S. Anal. Biochem. 143 3410(1984))をもとにしたYamamotoらの方法(Yamamoto, N.ら J.Biochem. (1993) 114, 740)に準じて測定したU/OD590の値が400以上を示す菌株が好ましい。また、下記の菌学的性質を有するラクトバチルス・ヘルペティカス菌株を用いることができる。

【0009】

菌学的性質

1. 形態学的性質: 1) 細胞の形状; 桿菌、2) 運動性; なし、3) 孢子の有無; なし、4) グラム染色性; 陽性。
2. 生理学的性質: 1) カタラーゼ; 陰性、2) インドール生成; 陰性、3) 硝酸塩の還元; 陰性、4) 酸素に対する態度; 通性嫌気性菌、5) グルコースによりホモ乳酸発酵によりDL(−)乳酸を生成し、ガスの産生はない。
- 6) 各種炭水化物の分解性: グルコース; +、ラクトース; +、マンノース; +、フラクトース; +、ガラクトース; +、シュクロース; −、マルトース; +、キシロース; −、ラムノース; −、セルビオース; −、トレハロース; −、メルビオース; −、ラフィノース; −、スタキオース; −、マンニトール; −、ソルビトール; −、エスクリン; −、サリシン; −。

【0010】

前記好ましいラクトバチルス・ヘルペティカスとしては、例えば、ラクトバチルス・ヘルペティカスCM4株(独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター 日本国茨城県つくば市東1-1-1中央第6 寄託番号:FERM BP-6060, 寄託日1997. 8. 15) (以下、CM4株と称す)が挙げられる。このCM4株は、特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に上記寄託番号で登録されており、この株は既に特許されている。

【0011】

前記発酵乳ホエーは、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスを含む発酵乳スターターを乳に添加し、発酵温度等の発酵条件を適宜選択して発酵させることにより得ることができる。

有効成分である発酵乳ホエーは、得られる発酵乳から遠心分離、ろ過等の常法の分離操作によりホエーを分離することにより得られるが、使用に際しては、分離せずに発酵乳の状態、また分離したホエーを適宜、分画、濃縮、精製等して用いることができる他、該ホエーやその濃縮物を凍結乾燥、噴霧乾燥等により粉末として用いることもできる。

【0012】

前記ラクトバチルス・ヘルペティカスは、あらかじめ前培養しておいた十分に活性の高

いスターターとして用いることが好ましい。初発菌数は、好ましくは $10^5 \sim 10^9$ 個/ml程度である。

有効成分である発酵乳ホエーを、特定保健用食品等の機能性飲食品として利用する場合に、風味を良好にし、嗜好性を良好とするために、前記ラクトバチルス・ヘルベティカスに酵母を併用することもできる。酵母の菌種は特に限定されないが、例えば、サッカロマイセス・セレビシェ等のサッカロマイセス属酵母等が好ましく挙げられる。酵母の含有割合は、その目的に応じて適宜選択することができる。

【0013】

原料の乳としては、例えば、牛乳、馬乳、羊乳、山羊乳等の動物乳、及び豆乳等の植物乳、これらの加工乳である脱脂乳、還元乳、粉乳、コンデンスミルク等が挙げられ、牛乳、豆乳、これらの加工乳が好ましく、牛乳又はその加工乳が特に好ましい。

乳の固形分濃度は特に限定されないが、例えば、脱脂乳を用いる場合の無脂乳固形分濃度は、通常3～15質量%程度であり、生産性的には6～15質量%が好ましい。

【0014】

前記発酵は、通常静置若しくは攪拌培養により、例えば、発酵温度 $25 \sim 45^\circ\text{C}$ 、好ましくは $30 \sim 45^\circ\text{C}$ 、発酵時間3～72時間、好ましくは12～36時間で、乳酸酸度が1.5以上になった時点で発酵を停止する方法等により行なうことができる。

【0015】

本発明の保湿剤は、前記有効成分である発酵乳ホエーの他に、他の保湿作用を有する公知の成分を含んでいても良く、更に、その形態に応じては、賦形剤等の各種添加剤が含まれていても良い。

本発明の保湿剤は、必須の有効成分が前記発酵乳ホエーであるので、その経口摂取量は、投与期間やその継続性等に応じて所望の効果が得られるよう適宜選択できるが、通常、前記発酵乳ホエー量で、1日あたり $1 \sim 1000 \text{ ml}$ /ヒト程度であり、好ましくは $10 \sim 200 \text{ ml}$ /ヒト程度である。

本発明の保湿剤の投与は、皮膚の水分低下等の症状が生じた後であっても、また、そのような症状を予防する時期に継続して毎日、若しくは断続的に摂取することができる。

【0016】

本発明の機能性飲食品は、本発明の保湿剤を含む食品及び飲料であって、保湿に関する予防や改善を訴求した、例えば、特定保健用食品等とすることができる。

前記機能性飲食品には、糖類、タンパク質、脂質、ビタミン、ミネラル、フレーバー、またはこれらの混合物等の添加物を添加することもできる。また、発酵乳ホエーを分離する前のホエー以外の乳成分を更に含んでいても良い。

本発明の機能性飲食品において、前記本発明の保湿剤の配合割合は、食品の形態や種類に応じて適宜選択することができ、その機能性飲食品の摂取継続性等に応じて適宜選択することができ特に限定されないが、有効成分である発酵乳ホエーとして、通常0.1～100質量%、好ましくは10～90質量%の範囲が適当である。

前記機能性飲食品の形態としては、例えば、ヨーグルト、乳酸菌飲料等の発酵乳製品、発酵乳ホエー又はその濃縮物等を配合した各種加工飲食品、乾燥粉末、錠剤、カプセル剤、顆粒剤等が挙げられる。

【0017】

本発明の機能性飲食品は、投与量及び投与時期については特に限定されないが、前記有効成分の投与量程度で摂取することが好ましく、例えば、皮膚に対して保湿が必要な環境等に接する前に継続的若しくは断続的に、更には、そのような環境に接した後に、継続的又は断続的に摂取することができる。

【実施例】

【0018】

以下、実施例を参照して本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例1及び比較例1～2

(発酵乳ホエー及び乳酸水溶液の調製)

固形率9質量%脱脂粉乳からなる乳培地にCM4株スターター(菌数 5×10^8 個/mL)を3%接種して、37℃で24時間、静置状態で発酵させ発酵乳を得た。この発酵乳を12000G、20分間遠心分離し、沈殿を除去し、発酵乳ホエー(以下、発酵乳ホエー(A)という)を調製した。

また、比較として濃度2.67w/w%の乳酸水溶液(以下、乳酸水溶液(a)という)を準備した(比較例1)。

【0019】

(SPT及びフィラグリン合成促進能の評価)

(1)表皮細胞(正常ヒトケラチノサイト、クラボウ社製)を、HuMedia-KG2(商品名、クラボウ社製)を培地として培養し、試験に供した。この表皮細胞を、 5×10^5 cells/ディッシュの細胞密度で35mm培養ディッシュに播種し、同培地で24時間培養した後、培地を、発酵乳ホエー(A)又は乳酸水溶液(a)をそれぞれ表1に示す各種濃度で含む同培地に交換し、さらに24時間培養した。

(2)培養終了後、細胞をPBS(-)にて洗浄し、500 μ L/ディッシュのTRIzol reagent(商品名、Gibco BRL社製)を用いて細胞を破碎した。100 μ L/ディッシュのクロロホルムを添加して、十分に混和した後、遠心操作によって上清の水層を得、2-プロパノールによりRNAを沈殿させ、全RNAを得た。この全RNAを冷75%エタノールで洗浄した後、DEPC水に溶解した。

(3)上記DEPC水に溶解したRNA1 μ gについて、One step RT-PCRキット(商品名、Qiagen社製)を用い、そのプロトコル及び表2に示すプライマー及び反応条件に従い、RT-PCRを実施し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ(SPT) mRNA、フィラグリンmRNA又はシクロフィリンmRNAに対応するcDNAの逆転写及び増幅を行なった。

(4)反応後、反応産物を1%アガロースを用いて電気泳動して分離した。泳動ゲルをエチジウムブロミドにて染色し、トランスイルミネーターに乗せ紫外線照射下写真撮影し、撮影されたバンドの輝度を測定した。

(5)SPT mRNAに由来するバンドの輝度又はフィラグリンmRNAに由来するバンドの輝度を、どの細胞においても同量が発現すると考えられるシクロフィリンmRNAに由来するバンドの輝度で割ることにより規格化し、さらにその値を、上記(1)において培地中の発酵乳ホエー濃度を0%としたもの(対照)を100とした相対値で表した。試験は2回行なった。それぞれの結果を表1に示す。

(6)別途、倍々希釈した各種の濃度の発酵乳ホエー(A)又は乳酸水溶液(a)を含むHuMedia-KG2培地において表皮細胞を培養し、培地中の発酵乳ホエー(A)又は乳酸水溶液(a)の、細胞毒性を示さない最高濃度を調べたところ、最高濃度はいずれも1.25%であった。

【0020】

【表1】

	濃度 (v/v%)	正常ヒト表皮細胞の SPT の mRNA 発現に対する作用		正常ヒト表皮細胞のフィラグリン の mRNA 発現に対する作用	
		1回目試験	2回目試験	1回目試験	2回目試験
対照	0	100	100	100	100
比較例1 乳酸水溶液(a)	0.63	91	111	15	132
	1.25	84	129	87	116
実施例1 発酵乳ホエー(A)	0.63	153	171	509	196
	1.25	156	154	543	168

【0021】

【表 2】

遺伝子	配列	PCR 条件	
		温度(°C)	サイクル
SPT	センス	58	30
	アンチセンス		
フィラグリン	センス	56	30
	アンチセンス		
シクロフィリン	センス	58	30
	アンチセンス		

【0022】

(発酵乳ホエー(A)含有飲料、未発酵乳ホエー含有飲料の調製)

上記調製した発酵乳ホエー(A)を飲用し易くするために、発酵乳ホエー(A)90質量部、香料0.25質量部、アスパルテーム0.05質量部及び水9.70質量部を混合し、発酵乳ホエー(A)含有飲料(実施例1)を調製した。

また、比較として、上記発酵乳ホエー(A)の調製に用いた固形率9質量%脱脂粉乳に、乳酸を酸度が2.2%となるように加えた後、12000G、20分間遠心分離して固形分を除去することにより未発酵乳ホエーを調製した。次いで、得られた未発酵ホエー90質量部、香料0.25質量部、アスパルテーム0.05質量部及び水9.70質量部を混合し、未発酵乳ホエー含有飲料(比較例2)を調製した。

【0023】

(経口摂取による評価)

24～43歳の平均年齢29.4歳である男性パネル32名の顔面右頬の皮膚表面水分量を測定し、これらの測定値の各パネルにおける平均値が略同等となるように16名ずつ2群に分けた。

前記2群に分けた一方の群のパネルに上記発酵乳ホエー(A)含有飲料を、他方の群のパネルに上記未発酵乳ホエー含有飲料を、毎日1名あたり150gずつ、3週間継続して飲用してもらい、以下の評価を行った。

【0024】

(皮膚表面水分量の評価)

各飲料の飲用前、飲用後3週間後において、顔面右頬をSKICON 200(商品名、I.B.S.Co. Ltd. 製)を用いて皮膚表面水分量を測定した。測定は各3回行い、その測定値の平均値をもってその部位の皮膚表面水分量とした。結果を表3に示す。

また、前記飲用前と飲用後3週間後の結果を、各群のパネルを乾燥肌と普通肌に分けて表示した結果を表4に示す。

【0025】

【表 3】

	飲用前	飲用3週間後
	Mean ± SD	Mean ± SD
発酵乳ホエー(A)含有飲料 (実施例1)	128.8 ± 56.4	90.3 ± 76.7
未発酵乳ホエー含有飲料 (比較例2)	117.5 ± 87.7	53.6 ± 35.5

単位はμS

【0026】

【表 4】

		飲用前	飲用 3 週間後
		Mean \pm SD	Mean \pm SD
発酵乳ホエー(A)含有飲料 (実施例 1)	乾燥肌	82.8 \pm 30.2	85.3 \pm 86.6
	普通肌	169.0 \pm 40.1	94.8 \pm 72.7
未発酵乳ホエー含有飲料 (比較例 2)	乾燥肌	69.4 \pm 41.9	48.0 \pm 28.1
	普通肌	197.7 \pm 87.0	62.9 \pm 46.8

単位は μ S

【0027】

表 3 より、実施例 1 及び比較例 2 のいずれにおいても経口摂取前に比べ皮膚水分量が経時的に低下しているが、これは季節変化によるものと予測できる。そして、皮膚水分量の低下率が、比較例 2 に比べ実施例 1 の方が少ないことが判った。従って、この評価試験により、発酵乳ホエー(A)含有飲料を飲用することにより皮膚表面水分量の低下を抑制すること、即ち、皮膚の保湿効果が得られることが判った。

また、表 4 より、乾燥肌のヒトも普通肌のヒトも同様な保湿効果が得られることが判った。

【0028】

参考例

(クリーム調製)

1, 3-ブチレングリコール 3.00 質量部、パラオキシ安息香酸エステル(メチルパラベン) 0.10 質量部、カルボキシビニルポリマー(商品名カーボポール980、日光ケミカルズ社製) 40.00、発酵乳ホエー(A) 5.00 質量部及び水 25.90 質量部を混合攪拌した後、L-アルギニン 10 質量%水溶液 12.00 質量部及び水 14.00 質量部を加え、均一に混合して発酵乳ホエー(A)含有クリーム(以下、ホエー(A)含有クリームと略す)を調製した。

また、1, 3-ブチレングリコール 3.00 質量部、パラオキシ安息香酸エステル(メチルパラベン) 0.10 質量部、カルボキシビニルポリマー(商品名カーボポール980、日光ケミカルズ社製) 40.00 及び水 30.90 質量部を混合攪拌した後、L-アルギニン 10 質量%水溶液 12.00 質量部及び水 20.00 質量部を加え、均一に混合して発酵乳ホエーを含まないクリーム(以下、比較クリームと略す)を調製した。

【0029】

(塗布による評価)

24~43 歳の平均年齢 31.4 歳である男性パネル 15 名の顔面右頬の皮膚表面水分量を測定し、これらの測定値の各パネルにおける平均値が略同等となるように 8 名と 7 名の 2 群に分けた。

前記 2 群に分けた一方の群のパネルに上記ホエー(A)含有クリームを、他方の群のパネルに上記比較クリームを、後述する右頬部位に毎日朝夕の 2 回づつ、3 週間継続して塗布してもらい、以下の評価を行った。

【0030】

(皮膚表面水分量の評価)

各クリーム塗布前、塗布 3 週間後において、顔面右頬を SKICON 200(商品名、I.B.S.Co. Ltd. 製)を用いて皮膚表面水分量を測定した。測定は各 3 回行い、その測定値の平均値をもってその部位の皮膚表面水分量とした。結果を表 5 に示す。

【0031】

【表 5】

	塗布前	塗布 3 週間後
	Mean ± SD	Mean ± SD
ホエー(A)含有クリーム	142.1 ± 100.3	72.4 ± 59.5
比較クリーム	144.9 ± 97.6	77.8 ± 46.9

単位は μS

【 0 0 3 2 】

表 5 より、ホエー(A)含有クリームは、該発酵乳ホエー(A)を含まない比較クリームと同様に皮膚表面水分量の低下を抑制する効果は認められないことが判る。従って、発酵乳ホエー(A)は、皮膚塗布による保湿効果が得られないことが判った。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 経口摂取により皮膚の保湿作用が得られ、安全性にも優れ、常用も可能である機能性飲食品及び該機能性飲食品等に用いる経口摂取用保湿剤を提供すること。

【解決手段】 本発明の経口摂取用保湿剤は、ラクトバチルス・ヘルベティカスにより乳を発酵させて得られる発酵乳ホエーを有効成分として含み、本発明の機能性飲食品は、該保湿剤を含み、保湿作用を有する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 3 2 2 5 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 0 4 3 5 3]

1. 変更年月日	2 0 0 4 年 8 月 2 5 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都渋谷区恵比寿南二丁目 4 番 1 号
氏 名	カルピス株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019330

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-322587
Filing date: 05 November 2004 (05.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse